

RosetteSep™ HLA Total Lymphocyte Enrichment Cocktail

REF	15263HLA	10 mL	For labeling 250 mL of whole blood
REF	15283HLA	40 mL	For labeling 1000 mL of whole blood

ENGLISH

INTENDED USE

RosetteSep™ cell enrichment cocktails are designed for the *in vitro* enrichment of specific cell subsets from human cell sources, including whole blood.

For professional *in vitro* diagnostic use only.

PRODUCT SPECIFICATIONS

RosetteSep™ HLA Total Lymphocyte Enrichment Cocktail REF **#15223HC.1**

This cocktail contains a combination of mouse and rat monoclonal antibodies. These antibodies are bound in bispecific Tetrameric Antibody Complexes (TACs) which are directed against cell surface antigens on human hematopoietic cells (CD16, CD36, CD66b), and glycophorin A on red blood cells. The mouse monoclonal antibody subclass is IgG_1. It should be kept in mind that this product is a biological reagent, and as such cannot be completely characterized or quantified. Some variability is unavoidable.

PRINCIPLE OF METHOD

The RosetteSep™ antibody cocktail crosslinks unwanted cells in human whole blood to multiple red blood cells (RBCs), forming immunorosettes. This increases the density of unwanted (rosetted) cells, so that they pellet along with the free RBCs when centrifuged over a buoyant density medium such as Ficoll-Paque™ PLUS (Catalog #07917/07957/07967), Ficoll-Paque™ PREMIUM (Catalog #07908/07968), or RosetteSep™ DM-L (Catalog #15705). Desired cells are never labeled with antibody and are easily collected as a highly enriched population at the interface between the plasma and the buoyant density medium.

QUALITY CONTROL

RosetteSep™ cell enrichment cocktails are aseptically manufactured using tightly controlled processes and pre-tested components.

Each lot of RosetteSep™ cell enrichment cocktail is sterility tested according to USP standards and Quality Control performance tested in cell separation assays using human whole blood.

LIMITATIONS

Product has been CE Marked in the European Union according to the 98/79/EC *In Vitro* Diagnostic Device Directive and complies with its requirements.

Additional terms and conditions may apply.

STORAGE

Store at 2 - 8°C. This product may be shipped at 15 - 25°C, but should be refrigerated upon receipt. Do not freeze.

STABILITY

Product stable at 2 - 8°C until expiry date as indicated on label.

PRECAUTIONS

1. For professional users only.
2. Do not use cocktail if vial contents have leaked. Unused cocktail may be disposed of according to standard laboratory procedures for non-hazardous liquids.
3. This product should be handled by trained personnel observing good laboratory practices. Once this product is added to human cells, treat the suspension as potentially biohazardous. Handling of reagents and disposal of wastes should observe all local, state, or national regulations.
4. This product is a potential irritant to eyes, respiratory system, and skin. This product may also be harmful if ingested. Avoid exposure through skin, eye contact, inhalation, and ingestion.

SPECIAL MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Density Medium

Density medium refers to Ficoll-Paque™ PLUS (Catalog #07917/07957/07967), Ficoll-Paque™ PREMIUM (Catalog #07908/07968) or RosetteSep™ DM-L (Catalog #15705).

Recommended Medium

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with 2% Fetal Bovine Serum (PBS + 2% FBS, Catalog #07905).

STEMCELL Technologies Inc | **400 – 570 West 7th Avenue, Vancouver, BC** | **V5Z 1B3** | **Canada** | **www.stemcell.com**

For Technical Assistance
Tel: +1.604.877.0713
e-mail: info@stemcell.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover • Germany





HANDLING AND DIRECTIONS FOR USE

Ensure that blood sample, recommended medium, density medium (see "Special Materials Required but Not Provided"), and centrifuge are all at room temperature (15 - 25°C).

1. Add RosetteSep™ HLA Cocktail at **40 µL/mL** of whole blood* (e.g. for 2 mL of whole blood, add 80 µL of cocktail). Mix well.

   **If using samples other than fresh whole blood, see "Notes".*

2. Incubate **20 minutes** at room temperature (15 - 25°C).
3. Dilute sample with an equal volume of PBS + 2% FBS and mix gently.
4. Layer the diluted sample on top of the density medium
   OR
   Layer the density medium underneath the diluted sample.

   Be careful to minimize mixing of the density medium and sample.

   See Table 1 for volume recommendations. With 50 mL conical tubes, we suggest using 15 mL of density medium, to make removal of the enriched layer after centrifugation easier.

Table 1: Recommended Volumes and Tube Sizes

WHOLE BLOOD (mL)	PBS + 2% FBS (mL)	DENSITY MEDIUM (mL)	TUBE SIZE (mL)
1	1	1.5	5
2	2	3	14
3	3	3	14
4	4	4	14
5	5	15	50
10	10	15	50
15	15	15	50

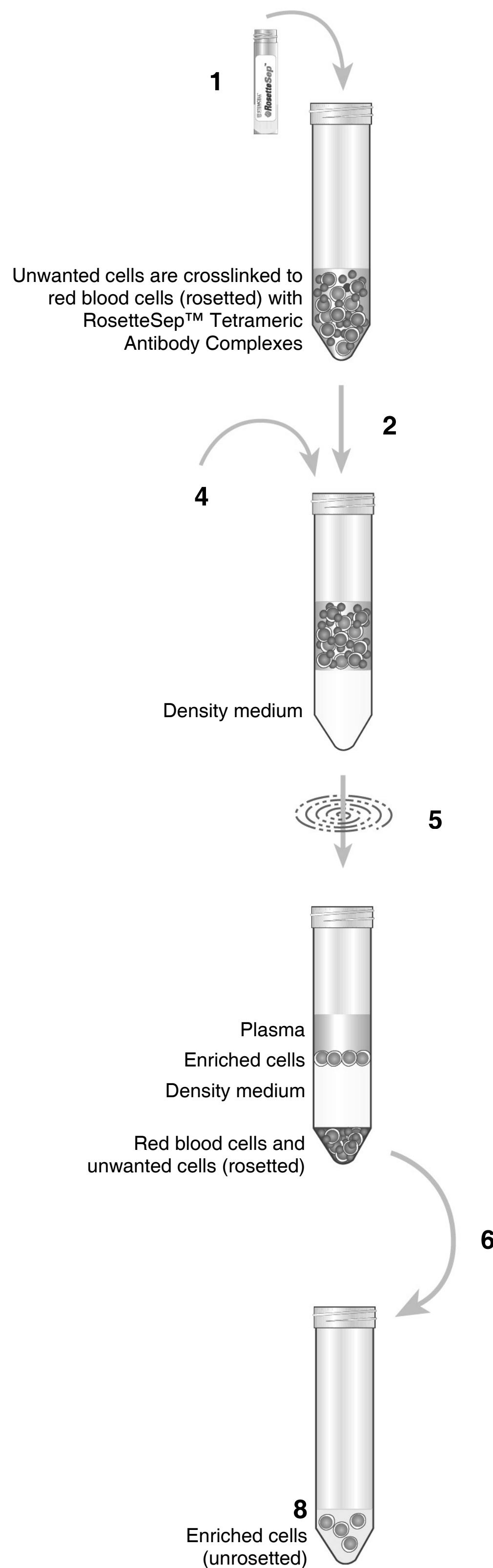
5. Centrifuge for **20 minutes** at 1200 *x g* (see "Notes") at room temperature (15 - 25°C) with the brake off.
6. Remove the enriched cells from the density medium : plasma interface.

   Sometimes it is difficult to see the cells at the interface, especially when very rare cells are enriched. It is advisable to remove some of the density medium along with the enriched cells in order to ensure optimal recovery.

7. Wash enriched cells once with PBS + 2% FBS. Repeat.
8. Use enriched cells as desired. We recommend that enriched samples are lysed with ammonium chloride to remove residual red blood cells prior to flow cytometric analysis (this can be done as one of the wash steps) or if residual red blood cells will interfere with subsequent assays.

ROSETTESEP™ PROCEDURE

Numbers refer to steps in "Handling and Directions for Use".



NOTES

Samples other than Whole Blood

Although RosetteSep™ has been optimized for use with whole blood, cells can be enriched from other sources (e.g. buffy coat, leukapheresis samples). The concentration of nucleated cells in the sample should not exceed 5 x 10^7 cells/mL, and red blood cells (RBCs) should be present at a ratio of at least 30 - 50 RBCs per nucleated cell.

Conversion of *g* to RPM

To convert *g* to rpm, use the following formula:

$$RPM = \sqrt{\frac{RCF}{(1.118 \times 10^{-5}) \times (Radius)}}$$

Where: RCF = relative centrifugal force (*g*)
RPM = centrifuge speed in revolutions per minute
Radius = radius of rotor in cm

Assessing Purity

Purity of lymphocytes can be measured by flow cytometry after staining with fluorochrome conjugated antibodies against CD3 (e.g. FITC anti-CD3, Catalog #10402) and CD19 (e.g. PE anti-CD19, Catalog #10509). Lymphocytes are either $CD3^+$ or $CD19^+$ (Note that $CD3^+CD16^+$ NK cells are removed during the RosetteSep™ procedure).

Typical Results

These results are for illustrative purposes only. They were obtained using samples from normal, healthy adults. Results from individual patient samples may vary.

CATALOG #	CELL TYPE ENRICHED	PURITY
15263HLA/15283HLA	Total Lymphocytes (T ($CD3^+$) & B ($CD19^+$) Cells)	>80%

TECHNICAL ASSISTANCE

For technical support please contact us by email at info@stemcell.com or call **+1.604.877.0713**.

For more information please visit www.stemcell.com.

EC REP **MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

REF Catalog or reference number	LOT Batch code	Use by: MM-YYYY
Caution, consult accompanying documents	IVD *In Vitro* Diagnostic Medical Device	For storage within temperature limits
STERILE A Aseptic Processing	Manufacturers identification (name & address)	EC REP Authorized EC representative in the European Community
CE Mark		

FRANÇAIS

RosetteSep™ HLA - Cocktail d'enrichissement en lymphocytes totaux

REF	**15263HLA**	**10 mL**	**Pour un marquage à 250 mL de sang total**
REF	**15283HLA**	**40 mL**	**Pour un marquage à 1 000 mL de sang total**

UTILISATION CONSEILLÉE

Les cocktails d'enrichissement en cellules RosetteSep™ sont destinés à l'enrichissement *in vitro* de sous-populations de cellules spécifiques tirées de sources cellulaires humaines, dont le sang total.

Réservé uniquement à un usage de diagnostic *in vitro* professionnel.

CARACTERISTIQUES DU PRODUIT

Cocktail d'enrichissement en lymphocytes totaux HLA RosetteSep™ REF **N° : 15223HC.1**

Ce cocktail contient une combinaison d'anticorps monoclonaux de souris et de rat. Ces anticorps sont liés de façon à former des complexes anticorps tétramériques (TACs) bispécifiques dirigés contre les antigènes de surface cellulaire des cellules hématopoïétiques humaines (CD16, CD36, CD66b) et la Glycophorin A des globules rouges. Les anticorps monoclonaux de souris utilisés sont de sous type IgG_1. Il est à noter que ce produit étant un réactif biologique, il ne peut donc être entièrement caractérisé ou quantifié. De ce fait, nous ne pouvons exclure une certaine variabilité.

PRINCIPE DE LA METHODE

Le cocktail d'anticorps RosetteSep™ permet la liaison des cellules indésirables du sang total humain aux globules rouges (GR), formant ainsi des rosettes. Ces dernières augmentent la densité des cellules indésirables (rosettes), de sorte à former un culot avec les GR libres lorsqu'elles sont centrifugées par milieu de gradient de densité tel que Ficoll-Paque™ PLUS (Référence Nº 07917/07957/07967), Ficoll-Paque™ PREMIUM (Référence Nº 07908/07968) ou RosetteSep™ DM-L (Référence Nº 15705). Les cellules d'intérêt fortement enrichie par cette méthode ne sont jamais marquées par un anticorps et sont facilement collectées à l'interface entre le plasma et Ficoll-Paque™.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les cocktails d'enrichissement en cellules RosetteSep™ sont fabriqués en milieu stérile au moyen de processus strictement contrôlés et de composants pré-testés.

Chaque lot de cocktail d'enrichissement en cellules RosetteSep™ est testé pour la stérilité afin de répondre aux normes USP, ainsi qu'un test de performance d'isolation cellulaire sur sang totale humain et de contrôle qualité.

GARANTIES ET LIMITES

Ce produit a reçu le marquage CE dans l'Union Européenne conformément à la Directive 98/79/EC relative aux Dispositifs Médicaux de Diagnostic *In Vitro* et se conforme à ses obligations.

Des conditions supplémentaires peuvent s'appliquer..

CONSERVATION

Conservation à 2 - 8 °C. Ce produit peut être transporté à 15 - 25 °C, mais doit être réfrigéré dès réception. Ne pas congeler.

STABILITÉ

Produit stable à 2 - 8 °C jusqu'à sa date d'expiration, comme indiqué sur l'étiquette.

PRÉCAUTIONS

1. Réservé aux professionnels.
2. Ne pas utiliser le cocktail en cas de fuite du contenu des flacons. Tout cocktail inutilisé doit être jeté conformément aux procédures de laboratoire standard relatives aux liquides non dangereux.
3. Ce produit doit être manipulé par du personnel qualifié selon les bonnes pratiques de laboratoire. Une fois ce produit ajouté aux cellules humaines, la suspension doit être considérée comme potentiellement un danger biologique. La manipulation des réactifs et l'élimination des déchets doivent respecter l'ensemble de la règlementation locale, étatique ou nationale.
4. Ce produit est potentiellement irritant pour les yeux, le système respiratoire et la peau. Ce produit peut également être dangereux en cas d'ingestion. Éviter toute exposition cutanée, le contact avec les yeux, l'inhalation et l'ingestion.

MATERIEL SPECIAL NÉCESSAIRE NON FOURNI

Milieu de gradient de densité

Le milieu de gradient de densité fait référence au Ficoll-Paque™ PLUS (Référence Nº 07917/07957/07967), Ficoll-Paque™ PREMIUM (Référence Nº 07908/07968) ou RosetteSep™ DM-L (Référence Nº 15705).

Milieu recommandé

Tampon Dulbecco phosphate salin avec 2 % de Sérum fétal bovin (PBS + 2 % FBS, Référence Nº 07905).

Ficoll™, Ficoll-Paque™ PLUS et Ficoll-Paque™ PREMIUM sont des marques commerciales de GE Healthcare Limited.

MANIPULATION ET MODE D'EMPLOI

Vérifier que l'échantillon de sang, le milieu recommandé, le milieu de gradient de densité (cf. «Matériel spécial nécessaire non fourni») et la centrifugeuse sont à température ambiante (15 - 25 °C).

1. Ajouter le cocktail HLA RosetteSep™ à **40 µL/mL** de sang total* (par ex. : pour 2 mL de sang total, ajouter 80 µL de cocktail). Bien mélanger.

   **En cas d'utilisation d'échantillons autres que du sang total frais, se référer aux « Notes ».*

2. Incuber **20 minutes** à température ambiante (15 - 25 °C).
3. Diluer l'échantillon au ½ avec du PBS + 2 % FBS puis mélanger doucement.
4. Disposer l'échantillon dilué au-dessus du milieu de gradient de densité.
   OU
   Disposer le milieu de gradient de densité sous l'échantillon dilué.

   Eviter de mélanger entre le milieu de gradient de densité et l'échantillon.

   Se référer au Tableau 1 pour les recommandations de volume. Pour des tubes coniques de 50 mL, nous conseillons d'utiliser 15 mL de milieu de gradient de densité, afin de faciliter la récupération de la fraction enrichie après centrifugation.

Tableau 1 : Volumes recommandés et Tailles des tubes

SANG TOTAL (mL)	PBS + 2 % FBS (mL)	MILIEU DE GRADIENT DE DENSITE (mL)	TAILLE DU TUBE (mL)
1	1	1,5	5
2	2	3	14
3	3	3	14
4	4	4	14
5	5	15	50
10	10	15	50
15	15	15	50

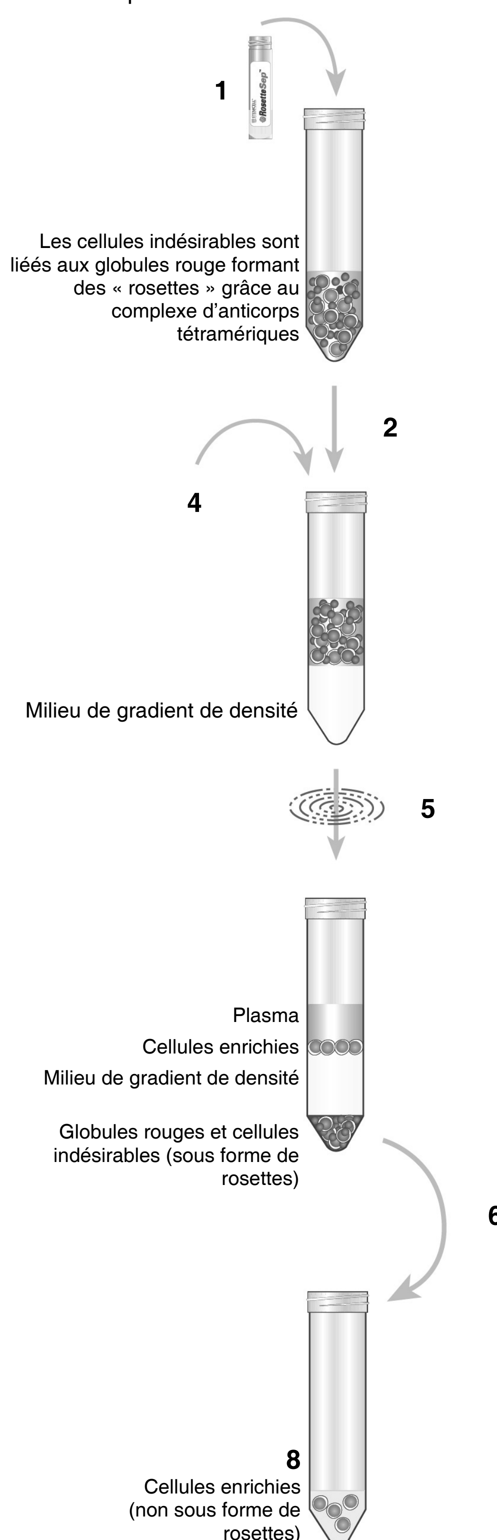
5. Centrifuger pendant **20 minutes** à 1 200 *x g* (cf. « Notes ») à température ambiante (15 - 25 °C), sans frein.
6. Récupérer les cellules enrichies du milieu de gradient de densité à l'interface plasma.

   Il est parfois difficile de voir les cellules à l'interface, notamment lorsque l'enrichissement concerne très peu de cellules. Il est recommandé de retirer une partie du milieu de gradient de densité avec les cellules enrichies, afin de garantir une récupération optimum.

7. Laver les cellules enrichies une première fois avec du PBS + 2 % FBS. Répéter.
8. Utiliser les cellules enrichies, selon les besoins. Nous recommandons de lyser les échantillons enrichis avec du chlorure d'ammonium afin d'éliminer les globules rouges résiduels préalablement à l'analyse cytométrie de flux (ceci peut être réalisé durant une étape du lavage). Les globules rouges résiduels peuvent interférer avec des tests ultérieurs.

DIAGRAMME DE PROTOCOLE ROSETTESEP™

Les numéros renvoient aux étapes de la section « Manipulation et Mode d'emploi ».



NOTES

Échantillons autres que du sang total

Bien que RosetteSep™ ait été optimisé pour une utilisation avec du sang total, les cellules peuvent être enrichies à partir d'autres sources (tel que: la couche leucocyto-plaquettaire, des échantillons de leucaphérèse). La concentration de cellules nucléées dans l'échantillon ne doit pas dépasser 5 x 10^7 cellules/mL, et les globules rouges (GR) doivent être présents à un ratio d'au moins 30 - 50 GR par cellule nucléée.

Conversion de *g* en tr/min

Pour convertir *g* en tr/min, utiliser la formule suivante :

$$\text{tr/min} = \sqrt{\frac{\text{RCF}}{(1{,}118 \times 10^{-5}) \times (\text{Radius})}}$$

Où : FCR = force centrifuge relative (*g*)
tr/min = vitesse centrifuge en tour par minute
Radius = rayon du moteur en cm

Contrôle de la pureté

La pureté des lymphocytes peut être mesurée par cytométrie de flux après marquage à l'aide d'un anticorps anti-CD3 conjugué à un fluorochrome (par ex. : FITC anti-CD3, Référence Nº 10402) et CD19 (par ex. : PE anti-CD19, Référence Nº 10509). Les lymphocytes correspondent soit à $CD3^+$ soit à $CD19^+$ (Noter que les cellules $CD3^+CD16^+$ NK sont déplétées pendant la procédure RosetteSep™).

Résultats typiques

Ces résultats sont uniquement donnés à titre d'illustration. Ils ont été obtenus à l'aide d'échantillons provenant d'adultes normaux en bonne santé. Les résultats peuvent varier d'un échantillon de donneur à un autre.

RÉFÉRENCE N°	TYPE DE CELLULES ENRICHIES	PURETÉ
15263HLA/15283HLA	Lymphocytes totaux (cellules T ($CD3^+$) et B ($CD19^+$))	>80%

ASSISTANCE TECHNIQUE

Pour joindre l'Assistance technique, veuillez nous contacter par email à l'adresse: info@stemcell.com ou par téléphone au numéro: **+1.604.877.0713**.

Pour de plus amples informations, veuillez visiter le site: www.stemcell.com.

EC REP **MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

REF Référence du catalogue	LOT Numéro de lot	Utiliser jusque: MM-AAAA
Attention: voir notice d'instructions	IVD Dispositif médical de diagnostic *In vitro*	Limites de températures
STERILE A Méthode de stérilisation utilisant des techniques d'asepsie	Fabriquant	EC REP Représentant autorisé dans la Communauté Européenne
CE Marquage CE		

ESPAÑOL

RosetteSep™ para enriquecimiento de linfocitos totales

REF **15263HLA 10 mL Para marcar 250 mL de sangre total**

REF **15283HLA 40 mL Para marcar 1000 mL de sangre total**

USO PREVISTO

Los cócteles de enriquecimiento celular RosetteSep™ están diseñados para enriquecer *in vitro* subpoblaciones celulares específicas de origen humano, incluida la sangre total.

Destinado únicamente para profesionales del diagnóstico *in vitro*.

ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO

RosetteSep™ HLA para enriquecimiento linfocitos totales REF **N.º 15223HC.1**

El cóctel contiene una combinación de anticuerpos monoclonales de ratón y rata. Estos anticuerpos están ligados en complejos de anticuerpos tetraméricos (tetrameric antibody complexes, TAC) biespecíficos, dirigidos contra los antígenos de la superficie celular de células hematopoyéticas humanas (CD16, CD36, CD66b) y la glicoforina A en eritrocitos. La subclase del anticuerpo monoclonal de ratón es IgG_1. Se debe tener en cuenta que este producto es un reactivo biológico y, como tal, no puede ser caracterizado ni cuantificado completamente. Cierta variabilidad es inevitable.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El cóctel de anticuerpos RosetteSep™ entrecruza las células no deseadas en sangre total humana a múltiples eritrocitos formando inmunorosetas. Esto aumenta la densidad de las células no deseadas ("rosetadas"), por lo que se precipitan junto a los eritrocitos libres cuando se centrifugan en un medio de densidad flotante como Ficoll-Paque™ PLUS (n.º de catálogo 07917/07957/07967), Ficoll-Paque™ PREMIUM (n.º de catálogo 07908/07968) o RosetteSep™ DM-L (n.º de catálogo 15705). Las células deseadas no son nunca marcadas con anticuerpos y la población altamente enriquecida puede recogerse de forma sencilla en la intersección entre el plasma y el medio de densidad flotante.

CONTROL DE CALIDAD

Los cócteles de enriquecimiento celular RosetteSep™ se fabrican de forma aséptica utilizando procesos estrictamente controlados y componentes probados previamente.

Cada lote de cóctel de enriquecimiento celular RosetteSep™ se somete a pruebas de esterilidad según las normas USP (farmacopea estadounidense) y de control de calidad con pruebas de rendimiento en ensayos de separación celular con sangre total humana.

LIMITACIONES

El producto ha recibido la aprobación del Marcado CE en la Unión Europea con conformidad de la Directiva 98/79/CE de Dispositivos de Diagnóstico *In Vitro* y cumple con sus requisitos.

Podrán aplicarse términos y condiciones adicionales.

CONSERVACIÓN

Conservar a una temperatura de entre 2 y 8 °C. Este producto se puede enviar a temperaturas de entre 15 y 25 °C, pero debe refrigerarse en el momento de la recepción. No congelar.

ESTABILIDAD

El producto permanece estable a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

PRECAUCIONES

1. Destinado únicamente a usuarios profesionales.
2. No utilizar el cóctel si se ha producido una fuga del contenido del vial. El cóctel no utilizado se puede desechar de acuerdo a los procedimientos estándar de laboratorio para líquidos no peligrosos.
3. Este producto debe ser manipulado por personal capacitado y observando las buenas prácticas de laboratorio. Una vez que se ha añadido el producto a células humanas, la suspensión debe tratarse como peligro biológico potencial. La manipulación de los reactivos y el tratamiento de los residuos deberán realizarse observando toda la normativa local, estatal o nacional.
4. Este producto puede irritar los ojos, el sistema respiratorio y la piel. Este producto también puede ser perjudicial si se ingiere. Evitar la exposición sobre la piel, el contacto con los ojos, la inhalación y la ingesta.

MATERIALES ESPECIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Medio de densidad
Medio de densidad se refiere a Ficoll-Paque™ PLUS (n.º de catálogo 07917/07957/07967), Ficoll-Paque™ PREMIUM (n.º de catálogo 07908/07968) o RosetteSep™ DM-L (n.º de catálogo 15705).

Medio recomendado
Tampón fosfato salino de Dulbecco con 2% de suero fetal bovino (PBS + 2% FBS, n.º de catálogo 07905).

MANIPULACIÓN E INSTRUCCIONES DE USO

Asegurarse de que la muestra de sangre, el medio recomendado, el medio de densidad (consulte el apartado “Materiales especiales necesarios pero no suministrados”) y la centrífuga estén a temperatura ambiente (15-25 °C).

1. Añadir cóctel de HLA RosetteSep™ en una proporción de **40 µL/mL** de sangre total* (p. ej., para 2 mL de sangre total, añadir 80 µL de cóctel). Mezclar bien.

   **En caso de utilizar muestras que no sean sangre total fresca, consulte las “Notas”.*

2. Incubar durante **20 minutos** a temperatura ambiente (15-25 °C).
3. Diluir la muestra en un volumen equivalente de PBS + 2% FBS y mezclar con cuidado.
4. Añada una capa de la muestra diluida sobre el medio de densidad

   O

   Añada una capa de medio de densidad bajo la muestra diluida.

   Ponga atención para minimizar la posibilidad de que el medio de densidad se mezcle con la muestra.

   Consulte las recomendaciones de volumen en la Tabla 1. Con tubos cónicos de 50 mL, sugerimos utilizar 15 mL de medio de densidad para facilitar la recogida de la capa enriquecida tras la centrifugación.

Tabla 1: Volúmenes y tamaños de tubo recomendados

SANGRE TOTAL (mL)	PBS + 2% FBS (mL)	MEDIO DE DENSIDAD (mL)	TAMAÑO DE TUBO (mL)
1	1	1,5	5
2	2	3	14
3	3	3	14
4	4	4	14
5	5	15	50
10	10	15	50
15	15	15	50

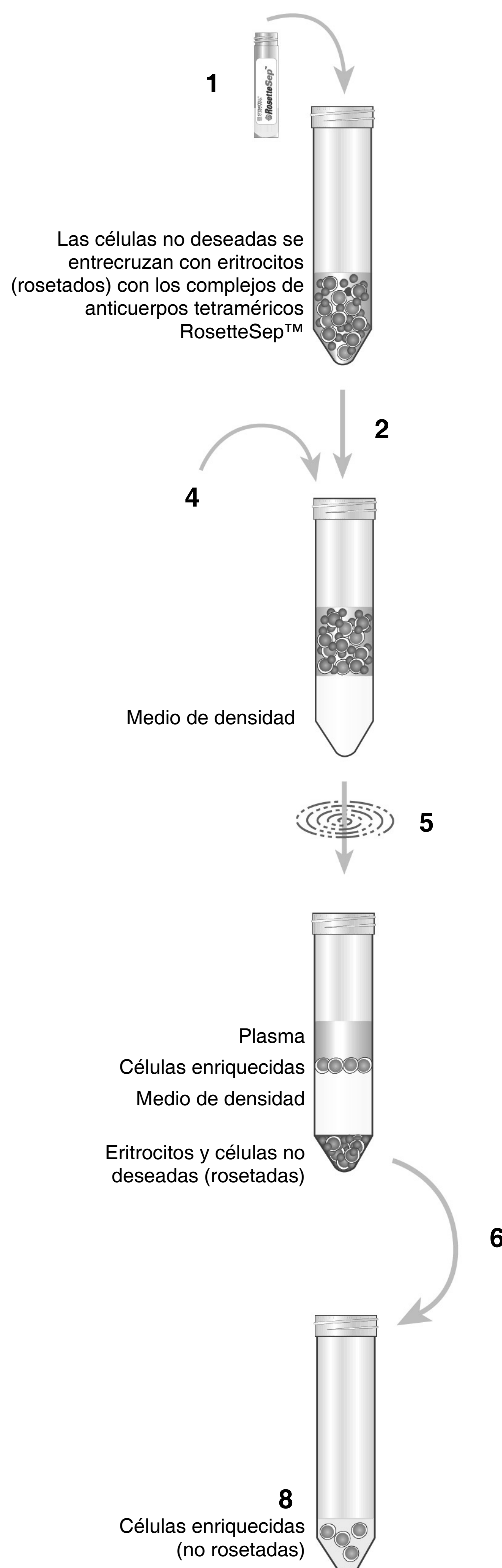
5. Centrifugar durante **20 minutos** a 1200 *x g* (consulte las “Notas”) a temperatura ambiente (15-25 °C) y sin freno.
6. Retirar las células enriquecidas de la interfase entre el medio de densidad y el plasma.

   En algunas ocasiones, es difícil ver las células en la interfase, especialmente cuando se enriquecen células muy poco comunes. Es aconsejable retirar parte del medio de densidad junto con las células enriquecidas a fin de asegurar una recuperación óptima.

7. Lavar las células enriquecidas una vez con PBS + 2% FBS. Repetir.
8. Utilice las células enriquecidas para el uso deseado. Recomendamos lisar las muestras enriquecidas con cloruro de amonio para eliminar eritrocitos residuales antes del análisis por citometría de flujo (esto se puede realizar como uno de los pasos de lavado) o si los eritrocitos pueden interferir en ensayos posteriores.

PROCEDIMIENTO ROSETTESEP™

Los números hacen referencia a los pasos descritos en “Manipulación e instrucciones de uso”.



NOTAS

Muestras de sustancias que no sean sangre total
Aunque RosetteSep™ se ha optimizado para su uso con sangre total, también pueden enriquecerse células procedentes de otras fuentes (p. ej., muestras de capa leucocitaria, leucaféresis). La concentración de células nucleadas en la muestra no debe exceder de 5 x 10^7 células/mL y la presencia de eritrocitos debe ser en una proporción de al menos 30 a 50 por cada célula nucleada.

Conversión de *g* a RPM
Para convertir *g* a rpm, utilice la fórmula siguiente:

$$RPM = \sqrt{\frac{RCF}{(1{,}118 \times 10^{-5}) \times (Radio)}}$$

Donde: RCF = fuerza centrífuga relativa (*g*)
RPM = velocidad de centrifugado en revoluciones por minuto
Radio = radio del rotor en cm

Evaluación de la pureza
Se puede medir la pureza de los linfocitos por medio de citometría de flujo después de la tinción con anticuerpos anti-CD3 conjugados con un fluorocromo (p. ej., FITC anti-CD3, n.º de catálogo 10402) y CD19 (p. ej., PE anti-CD19, n.º de catálogo 10509). Los linfocitos son $CD3^+$ o $CD19^+$ (Tenga en cuenta que las células NK $CD3^+CD16^+$ se eliminan durante el procedimiento de RosetteSep™).

Resultados típicos
Estos resultados se presentan a modo ilustrativo únicamente. Se han obtenido utilizando muestras de individuos adultos normales y sanos. Los resultados de muestras de pacientes pueden variar.

N.º DE CATÁLOGO	TIPO DE CÉLULA ENRIQUECIDA	PUREZA
15263HLA/15283HLA	Total de linfocitos (Linfocitos T ($CD3^+$) y B ($CD19^+$))	>80%

ASISTENCIA TÉCNICA

Si necesita asistencia técnica, envíenos un correo electrónico a info@stemcell.com o llame al **+1.604.877.0713**.

Para más información, entre en www.stemcell.com.

EC REP **MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

REF Número de catálogo o de referencia	LOT Código de lote	Usar hasta: MM-AAAA
Precaución, consultar los documentos adjuntos	IVD Equipo médico para diagnóstico *in vitro*	Conservar dentro del rango de temperaturas
STERILE A Procesamiento Aséptico	Identificación del fabricante (nombre y domicilio)	EC REP Representante autorizado para la Comunidad Europea
CE Marca CE		

ITALIANO

RosetteSep™ HLA Cocktail di arricchimento linfocita totale

REF 15263HLA	**10 mL**	**Per l'etichettatura di 250 mL di sangue intero**
REF 15283HLA	**40 mL**	**Per l'etichettatura di 1000 mL di sangue intero**

USO PREVISTO

I cocktail di arricchimento cellulare RosetteSep™ sono destinati all'arricchimento *in vitro* di sottoinsiemi cellulari specifici da fonti di cellule umane, compreso il sangue intero.

Esclusivamente per utilizzo diagnostico professionale *in vitro*.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

RosetteSep™ HLA Cocktail di arricchimento di linfociti **REF N. 15223HC.1**

Questo cocktail contiene una combinazione di anticorpi monoclonali di topo e ratto. Gli anticorpi sono uniti in Complessi di anticorpi tetramerici (TAC) bispecifici i quali vengono diretti contro gli antigeni delle superfici cellulari in cellule ematopoietiche umane (CD16, CD36, CD66b) e glicoforina A su globuli rossi. La sottoclasse di anticorpi monoclonali di topo è IgG_1. Tenere presente che questo prodotto è un reagente biologico per cui non è possibile caratterizzarlo o quantificarlo interamente. Una qualche variabilità è inevitabile.

PRINCIPIO DI METODO

Il cocktail di anticorpi RosetteSep™ correla in modo incrociato le cellule indesiderate del sangue umano intero a globuli rossi multipli, così da formare immunorosette. Ciò aumenta la densità delle cellule (rosettate) indesiderate, in modo che si granulino con gli globuli rossi liberi quando sono centrifugate su un mezzo di densità galleggiante, come Ficoll-Paque™ PLUS (Catalogo #07917/07957/07967), Ficoll-Paque™ PREMIUM (Catalogo #07908/07968) o RosetteSep™ DM-L (Catalogo #15705). Le cellule desiderate non sono mai etichettate con anticorpi e vengono raccolte facilmente come popolazione altamente arricchita all'interfaccia tra il plasma e il mezzo di densità galleggiante.

CONTROLLI DI QUALITÀ

I cocktail di arricchimento cellulare RosetteSep™ sono prodotti in modo asettico in base a dei processi altamente controllati e componenti pretestati.

Ogni lotto di cocktail di arricchimento cellulare RosetteSep™ è sottoposto a test sulla sterilità conformi agli standard USP e a test di rendimento sul controllo qualità in analisi di separazione cellulare in cui viene usato del sangue umano intero.

LIMITAZIONI

Il prodotto ha il marchio CE nell'Unione Europea in conformità alla Direttiva 98/79/CE per i Dispositivi Diagnostici *In Vitro* ed è conforme ai suoi requisiti.

Si possono applicare ulteriori termini e condizioni.

CONSERVAZIONE

Conservare a 2 - 8°C. Questo prodotto può essere spedito a 15 - 25°C, ma deve essere messo in frigorifero alla ricezione. Non congelare.

STABILITÀ

Prodotto stabile a 2 - 8°C fino alla data di scadenza indicata nell'etichetta.

PRECAUZIONI

1. Solo per utilizzatori professionisti.
2. Non usare il cocktail in caso di perdite dalla fiala. I cocktail inutilizzati possono essere smaltiti in base alle procedure standard di laboratorio relative ai liquidi non pericolosi.
3. Il prodotto deve essere utilizzato da personale qualificato in base alle buone prassi di laboratorio. Una volta aggiunto il prodotto alle cellule umane, trattare la sospensione come potenzialmente biopericolosa. L'utilizzo di reagenti e lo smaltimento di scarti devono essere svolti in conformità alle disposizioni locali, statali o nazionali.
4. Questo prodotto è potenzialmente irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la pelle. Può inoltre essere dannoso se ingerito. Evitare l'esposizione alla pelle, il contatto con gli occhi, l'inalazione e l'ingestione.

MATERIALI SPECIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Mezzo di densità
Il mezzo di densità si riferisce a Ficoll-Paque™ PLUS (Catalogo #07917/07957/07967), Ficoll-Paque™ PREMIUM (Catalogo #07908/07968) o RosetteSep™ DM-L (Catalogo #15705).

Mezzo consigliato
Salina tamponata al fosfato Dulbecco con siero di bovino totale al 2% (PBS + 2% FBS, Catalogo #07905).

INDICAZIONI DI UTILIZZO

Accertarsi che il campione di sangue, il mezzo consigliato, il mezzo di densità (cfr. "Materiali speciali richiesti ma non forniti") e la centrifuga siano a temperatura ambiente (15 - 25°C).

1. Aggiungere il cocktail RosetteSep™ HLA a **40 µL/mL** di sangue intero* (ad es. per 2 mL di sangue intero, aggiungere 80 µL di cocktail). Mescolare bene.

   **Se si utilizzano campioni diversi dal sangue intero fresco, consultare le "Note".*

2. Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente (15 - 25°C).
3. Diluire il campione con un volume uguale di PBS + 2% FBS e mescolare delicatamente.
4. Sistemare il campione diluito sopra il mezzo di densità
   O
   Sistemare il mezzo di densità sotto il campione diluito.

   Fare attenzione a minimizzare la mescolatura del mezzo di densità e del campione.

   Cfr. Tabella 1 per le raccomandazioni sui volumi. Con i tubi conici da 50 mL, suggeriamo di utilizzare 15 mL di mezzo di densità, onde facilitare la rimozione dello strato arricchito dopo la centrifuga.

Tabella 1: Volumi consigliati e dimensioni dei tubi

SANGUE INTERO (mL)	PBS + 2% FBS (mL)	MEZZO DI DENSITÀ (mL)	DIMENSIONI TUBO (mL)
1	1	1,5	5
2	2	3	14
3	3	3	14
4	4	4	14
5	5	15	50
10	10	15	50
15	15	15	50

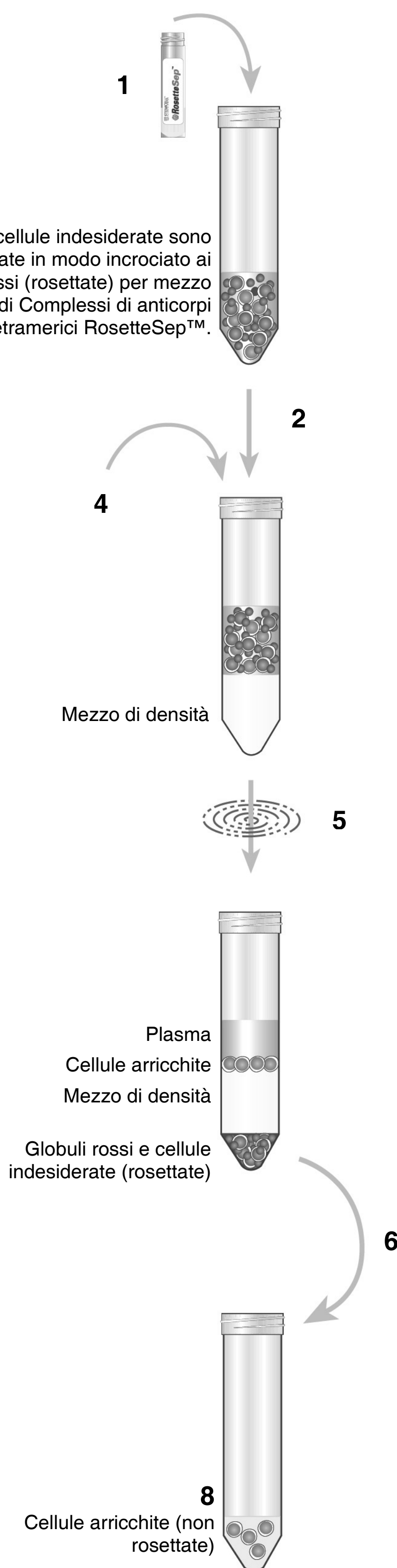
5. Centrifugare per **20 minuti** a 1200 *x g* (cfr. "Note") a temperatura ambiente (15 - 25°C) con il freno disattivato.
6. Togliere le cellule arricchite dal mezzo di densità : interfaccia plasma.

   Talvolta è difficile vedere le cellule nell'interfaccia, in particolare quando si arricchiscono cellule molto rare. Si consiglia di rimuovere parte del mezzo di densità insieme alle cellule arricchite onde assicurare una ripresa ottimale.

7. Lavare una volta le cellule arricchite con PBS + 2% FBS. Ripetere.
8. Utilizzare le cellule arricchite, se lo si desidera. Consigliamo di lisare i campioni arricchiti con cloruro di ammonio onde rimuovere i globuli rossi residui prima dell'analisi citometrica di flusso (questa operazione può essere effettuata durante il lavaggio) o se i globuli residui interferiranno con le analisi successive.

PROCEDURA ROSETTESEP™

I numeri si riferiscono ai passi di "Indicazioni di utilizzo".



NOTE

Campioni diversi dal sangue intero
Anche se RosetteSep™ è ottimizzato per l'uso con il sangue intero, è possibile arricchire le cellule da altre fonti (come crosta, campioni di leucaferesi). La concentrazione di cellule nucleate nel campione non deve superare 5 x 10^7 cellule/mL, e i globuli rossi devono essere presenti nel rapporto di almeno 30 - 50 globuli rossi per cellula nucleata.

Conversione di *g* in RPM
Per convertire *g* in rpm, usare la seguente formula:

$$RPM = \sqrt{\frac{RCF}{(1{,}118 \times 10^{-5}) \times (raggio)}}$$

In cui: RCF = forza centrifuga relativa (*g*)
RPM = velocità centrifuga in giri al minuto
Raggio = raggio del rotore in cm

Valutazione della purezza
È possibile misurare la purezza dei linfociti tramite la citometria a flusso dopo aver macchiato con anticorpi coniugati con fluorocromo contro CD3 (ad es. FITC anti-CD3, Catalogo #10402), CD19 (ad es. PE anti-CD19, Catalogo #10509). I linfociti sono $CD3^+$ o $CD19^+$ (si prega di notare che le cellule $CD3^+CD16^+$ NK sono rimosse durante la procedura RosetteSep™).

Risultati tipici
I seguenti risultati sono a scopo puramente illustrativo. Sono stati ottenuti utilizzando campioni di adulti normali sani. I risultati relativi ai singoli campioni di pazienti possono variare.

CATALOGO #	TIPO DI CELLULA ARRICCHITA	PUREZZA
15263HLA/ 15283HLA	Linfociti totali (cellule T ($CD3^+$) & B ($CD19^+$))	>80%

ASSISTENZA TECNICA

Per assistenza tecnica, contattarci per e-mail all'indirizzo info@stemcell.com o telefonare al numero **+1.604.877.0713**.

Per ulteriori informazioni visitare www.stemcell.com.

EC REP **MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

REF Numero di catalogo o di riferimento	LOT Lotto	Usare da: MM-AAAA
Attenzione, consultare i documenti allegati	IVD Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*	Conservare entro il range di temperatura
STERILE A In sterilità	ID del produttore (nome e indirizzo)	EC REP Rappresentante autorizzato EC dalla Comunità Europea
CE Marchio CE		

DEUTSCH

RosetteSep™ HLA Cocktail zur Anreicherung von T- u. B-Lymphozyten

REF **15263HLA 10 mL Zur Markierung von 250 mL Vollblut**

REF **15283HLA 40 mL Zur Markierung von 1000 mL Vollblut**

INTENDIERTE ANWENDUNG

RosetteSep™ Cocktails zur Zellanreicherung wurden zur *in-vitro*-Anreicherung spezifischer Zell-Populationen aus humanen erythrocytenhaltigen Probenmaterial, einschließlich Vollblut, hergestellt.

Nur für professionelle *in-vitro*-Diagnostik.

PRODUKTSPEZIFIKATIONEN

RosetteSep™ HLA Cocktail zur Anreicherung von T- und B-Lymphozyten REF **#15223HC.1**

Dieser Cocktail enthält eine Mischung monoklonaler Antikörper von Mäusen und Ratten. Die Antikörper sind in bi-spezifischen tetramerischen Antikörperkomplexen (TACs) gebunden, die gegen Zelloberflächenantigene auf humanen hämatopoetischen Zellen (CD16, CD36, CD66b) und Glykophorin A auf roten Blutkörperchen gerichtet sind. Die Unterklasse der monoklonalen Mausantikörper ist IgG_1. Es ist zu beachten, dass dieses Produkt ein biologischer Reagenz ist und aus diesem Grunde nicht vollständig charakterisiert oder quantifiziert werden kann. Gewisse Abweichungen sind unvermeidbar.

METHODISCHES PRINZIP

Der RosetteSep™ Antikörper-Cocktail quervernetzt unerwünschte Zellen und roten Blutkörperchen (RBK) im humanen Vollblut und bildet so Immunrosetten. Auf diese Weise erhöht sich die Dichte der unerwünschten Zellen (in den Rosetten), so dass diese beim Zentrifugieren in einem Dichtemedium wie Ficoll-Paque™ PLUS (Katalognr. 07917/07957/07967), Ficoll-Paque™ PREMIUM (Katalognr. 07908/07968) oder RosetteSep™ DM-L (Katalognr. 15705) nach unten zentrifugiert werden. Die unmarkierten Zielzellen finden sich als hoch angereicherte Population in der Interphase zwischen Plasma und Dichtegradientenmedium.

QUALITÄTSKONTROLLE

RosetteSep™ Cocktails zur Zellanreicherung werden mittels streng kontrollierter Verfahren und zuvor getesteter Komponenten steril hergestellt.

Jede Charge RosetteSep™ Cocktails zur Zellanreicherung wird gemäß USP (United States Pharmacopeia) auf Sterilität getestet und Qualitätskontrollen mit humanen Vollblut in Zelltrennungsanalysen durchgeführt.

EINSCHRÄNKUNGEN

Das Produkt ist in der Europäischen Union gemäß IVD-Richtlinie 98/79/EG für *In-Vitro*-Diagnostika mit der CE-Marke versehen und erfüllt deren Anforderungen.

Je nach Land bzw. Region können ggf. zusätzliche Bestimmungen zur Anwendung kommen.

LAGERUNG

Lagerung bei 2-8 °C. Das Produkt kann bei einer Temperatur von 15-25 °C transportiert werden, muss aber nach Erhalt gekühlt gelagert werden. Nicht einfrieren.

STABILITÄT

Produktstabilität bei 2-8 °C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum.

VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Nur für die professionelle Anwendung.
2. Cocktail nicht verwenden, wenn eine Beschädigung der Umverpackung vorliegt. Nichtverwendete Cocktails können gemäß den gängigen Laborverfahren für nicht gefährliche Flüssigkeiten entsorgt werden.
3. Die Handhabung dieses Produkts ist nur ausgebildetem Personal gestattet, das die Normen der guten Laborpraxis einhält. Wenn das Produkt humanen Zellen beigegeben wurde, ist die Suspension als potentiell biologisch gefährlich zu behandeln. Bei der Handhabung der Reagenzien und der Entsorgung von Abfallstoffen sind sämtliche regionalen oder nationalen Richtlinien einzuhalten.
4. Dieses Produkt kann Reizungen der Augen, des Atemsystems und der Haut verursachen. Das Produkt kann beim Verschlucken schädlich sein. Der Kontakt durch die Haut, Augenkontakt, Einatmung und orale Aufnahme sollten vermieden werden.

NOTWENDIGE, ABER NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE SONDERMATERIALIEN

Dichtemedium
Dichtemedium bezieht sich auf Ficoll-Paque™ PLUS (Katalognr. 07917/07957/07967), Ficoll-Paque™ PREMIUM (Katalognr. 07908/07968) bzw. RosetteSep™ DM-L (Katalognr. 15705).

Empfohlenes Medium
Dulbeccos Phosphat-Kochsalzlösung mit 2 % fetalem Rinderserum (PBS + 2 % FBS, Katalognr. 07905).

HANDHABUNG UND ANWENDUNGSHINWEISE

Stellen Sie sicher, dass die Blutprobe, das empfohlene Medium, das Dichtemedium (siehe „Notwendige, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Sondermaterialien“) und die Zentrifuge Zimmertemperatur (15-25 °C) haben.

1. RosetteSep™ HLA Cocktail zu **40 µL/mL** Vollblut* hinzugeben (z.B. bei 2 mL Vollblut 80 µL Cocktail hinzugeben). Gut mischen.

   **Falls keine Vollblut-Proben verwendet werden, lesen Sie bitte den Abschnitt „Anmerkungen“.*
2. **20 Minuten** bei Zimmertemperatur (15-25 °C) inkubieren.
3. Probe mit einem gleichen Volumen von PBS mit 2 % FBS verdünnen und vorsichtig mischen.
4. Die verdünnte Probe auf dem Dichtemedium aufschichten
   ODER
   Das Dichtemedium unter die verdünnte Probe schichten.

   Vermeiden Sie dabei die Vermischung von Dichtemedium und Probe.

   Empfohlene Volumina siehe Tabelle 1. Bei der Verwendung von 50 mL konische Röhren empfehlen wir mindestens 15 mL Dichtemedium, um das Abnehmen der Interphase nach dem Zentrifugieren zu vereinfachen.

Tabelle 1: Empfohlene Volumina und Röhrchengrößen

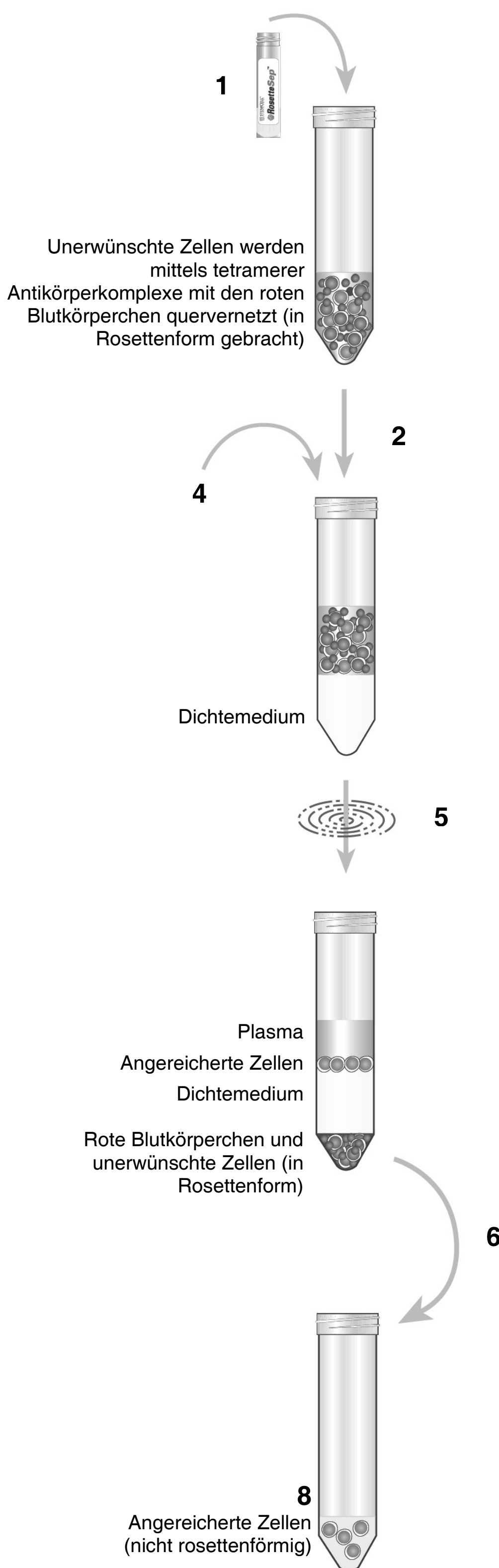
VOLLBLUT (mL)	PBS + 2 % FBS (mL)	DICHTEMEDIUM (mL)	RÖHRCHEN-GRÖSSE (mL)
1	1	1,5	5
2	2	3	14
3	3	3	14
4	4	4	14
5	5	15	50
10	10	15	50
15	15	15	50

5. **20 Minuten** bei 1200 *x g* (siehe Anmerkungen) bei Zimmertemperatur (15-25 °C) ohne Bremse zentrifugieren.
6. Zielzellen vom Dichtemedium entfernen : Interphase.

   Mitunter ist es schwierig, die Zellen in der Interphase zu erkennen, besonders wenn sehr seltene Zellen angereichert werden. Es empfiehlt sich, die Interphase großzügig (mit einem Teil des Dichtemediums) aufzunehmen, um eine optimale Gewinnung zu gewährleisten.
7. Angereicherte Zellen mit PBS + 2 % FBS waschen. Wiederholen.
8. Angereicherte Zellen wie gewünscht verwenden. Wir empfehlen, dass die angereicherten Proben mit Salmiak lysiert werden, um Rückstände roter Blutkörperchen vor der Durchflusszytometrie zu entfernen (dies kann während des Waschvorgangs erfolgen), oder falls rote Blutkörperchen nachfolgende Analysen beeinträchtigen.

ROSETTESEP™-VERFAHREN

Die Zahlen beziehen sich auf die unter „Handhabung und Anwendungshinweise“ angegebenen Schritte.



ANMERKUNGEN

Alternative Proben zu Vollblut

Obwohl RosetteSep™ für die Verwendung mit Vollblut optimiert wurde, können Zellen auch aus anderen erythrocytenhaltigen Probenmaterialien angereichert werden (z.B. Buffy-Coat, Leukapherese-Proben). Die Konzentration der kernhaltigen Zellen in der Probe sollte 5 x 10^7 Zellen/mL nicht überschreiten. Rote Blutkörperchen (RBK) sollten mindestens im Verhältnis von 30-50 RBKs pro kernhaltige Zelle vorliegen.

Umwandlung von *g* zu UpM (Drehzahl)

Zur Umwandlung von *g* in UpM, bitte folgende Formel verwenden:

$$\text{UpM} = \sqrt{\frac{\text{RZB}}{(1{,}118 \times 10^{-5}) \times (\text{Radius})}}$$

Wobei: RZB = Relative Zentrifugalbeschleunigung (*g*)
UpM = Umdrehung pro Minute
Radius = Rotorradius in cm

Reinheitsanalyse

Die Reinheit der erwünschten Zellen kann mittels Durchflusszytometrie nach der Einfärbung mit einem fluorochromkonjugierten anti-CD3-Antikörper gemessen werden (z.B. FITC anti-CD3, Katalognr. 10402), CD19 (z.B. PE anti-CD19, Katalognr. 10509). Lymphozyten sind entweder $CD3^+$ oder $CD19^+$ (Beachten Sie, dass $CD3^+CD16^+$ NK-Zellen während des RosetteSep™-Verfahrens entfernt werden).

Typische Ergebnisse

Diese Ergebnisse dienen ausschließlich Anschauungszwecken. Sie wurden aus Proben normaler, gesunder Erwachsener gewonnen. Die Ergebnisse individueller Patientenproben können voneinander abweichen.

KATALOGNR.	ANGEREICHERTER ZELLTYP	REINHEIT
15263HLA/ 15283HLA	Gesamtlymphozyten (T- ($CD3^+$) & B ($CD19^+$Zellen)	>80%

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Weitere technische Unterstützung erhalten Sie, indem Sie eine E-Mail an info@stemcell.com senden, oder telefonisch unter **+1.604.877.0713**.

Weitere Informationen finden Sie unter www.stemcell.com.

EC REP **MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

REF Katalog oder Referenznummer	LOT Lotnummer	Verbrauch bis: MM-JJJJ
Vorsicht, beiliegende Dokumentation beachten	IVD *In Vitro* Diagnostisches Medizinprodukt	Für Lagerung innerhalb der Temperaturgrenzen
STERILE A Aseptische Verarbeitung	Hersteller Identifikation (Name & Addresse)	EC REP Autorisierter Händler innerhalb der EU
CE Zeichen		